

⑫ 公開特許公報(A) 平4-51890

⑤ Int.Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成4年(1992)2月20日

C 12 N 1/20
 C 12 Q 1/04
 //(C 12 N 1/20
 C 12 R 1:19)
 (C 12 Q 1/04
 C 12 R 1:185)

A 7236-4B
 6807-4B

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全8頁)

⑭ 発明の名称 大腸菌群の増殖及び検出用培地

⑯ 特 願 平2-157064

⑰ 出 願 平2(1990)6月15日

⑱ 発 明 者 小 高 秀 正 茨城県結城市北南茂呂1265-5
 ⑱ 発 明 者 水 落 慎 吾 茨城県猿島郡総和町上辺見474-1
 ⑱ 発 明 者 中 楯 卓 埼玉県春日部市豊町5-1-11 アーバンハイム203
 ⑲ 出 願 人 日水製薬株式会社 東京都豊島区巣鴨2丁目11番1号
 ⑲ 代 理 人 弁理士 有賀 三幸 外2名

明 細 書

1. 発明の名称

大腸菌群の増殖及び検出用培地

2. 特許請求の範囲

1. 重量で、ペプトン1.0～2.5%、塩化ナトリウム0.25～0.5%、酵母エキス0.4～0.6%、グリセロール0.5～1.5%、リン酸一水素二カリウム0.2～0.5%、ピルビン酸ナトリウム0.05～5.0%、硝酸カリウム0.05～1.0%、牛胆汁末1.0～2.0%及び寒天0.1～0.3%を含有する大腸菌群増殖用培地。

2. 重量で、ペプトン1.0～2.5%、塩化ナトリウム0.25～0.5%、酵母エキス0.4～0.6%、グリセロール0.5～1.5%、リン酸一水素二カリウム0.2～0.5%、ピルビン酸ナトリウム0.05～5.0%、硝酸カリウム0.05～1.0%、牛胆汁末1.0～2.0%、寒天0.1～0.3%及び4-メチルーウンベリフェリル-β-D-ガラクトシド又は4-メチルーウンベリフェリル-β-D-グルクロニドを含有する大腸菌群検出用培地。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は大腸菌群の増殖用培地、更に詳しくは、ジェネレーションタイムが速く、増殖率がよく、ラグフェイズがなく、大腸菌群の検出用培地に適した培地に関する。

〔従来の技術〕

近年、微生物の汚染を防止するという社会的要請の強まりによって、食品、医薬品、化粧品、飲料水、尿等中に存在する大腸菌群を検査することが盛んになってきた。

従来から行われている大腸菌群の検査法としては、デゾキシコレート培地を用いて24時間培養した後、発育した菌のコロニー数を算出する方法、あるいはブリリアントグリーン乳糖ブイヨン(BGLB)、乳糖ブイヨン等を用いて24～48時間培養した後、ガスの産生が認められる試験管の本数を数えて菌数を算定する方法が知られている。

しかし、これらの方法は長時間を要し、現在の

流通体制に適合するためには迅速な検査法が望まれ、微生物が増殖する際に変化する電氣的抵抗を利用した迅速検出法や、微生物のもつATPを測定する方法等が開発された。しかし、これらの方法は、選択性及び精度性の点で必ずしも満足できるものではなかった。

また、近年、4-メチルーウンベリフェリル- β -D-ガラクトシド(4-MUGal)を含む栄養培地を使用して、大腸菌群が産生する β -ガラクトシダーゼによって4-MUGalを4-メチルーウンベリフェロン(4-MU)に変化させ、この4-MUの蛍光を測定する大腸菌群の迅速検出法が報告された(特開昭56-64797号及び特開昭57-144995号)。

〔発明が解決しようとする課題〕

しかるところ、4-MUGalを用いる検出法では、大腸菌群数が試料原液1mlあたり 10^{-4} ~ 10^{-5} 以上必要なため、食品等の比較的菌数の少ない大腸菌群を検出するには培養操作が必要となり、大腸菌群をより速く増殖させる培地が要求される。

ルーウンベリフェリル- β -D-グルクロニドを含む大腸菌群検出用培地に係る第2の発明を提供するものである。

本明細書において、「ジェネレーションタイム」とは、初発菌数より10倍以上増殖したときの時間をもって、その時の菌数(対数値)から初発菌数(対数値)を差し引いた値に係数3.3を乗じた値で、その時までの時間を除して得られる値であり、「増殖率」とは、初発菌数より10倍以上増殖したときの時間をもって、その時の菌数(対数値)から初発菌数(対数値)を差し引いた値に係数3.3を乗じた値を、その時までの時間で除して得られる値であり、また「ラグフェイズ」とは、増殖率測定時において、ある時点でサンプリングした菌が、その前にサンプリングしたときの菌数より少なくなっている時をいうものである。そして、大腸菌群検出用培地としては、ジェネレーションタイムが3分未満、増殖率が0.35以上で、ラグフェイズがない培地が好ましい。

本発明者は、従来公知の多くの培地について大

そして、従来再もよいとされている大腸菌群増殖用培地は、特開昭56-64797号公報に記載のブレインハートインフュージョンブロス・ブイオン培地(BHI)であるが、これも未だ十分に満足できるものでなく、よりジェネレーションタイムが速く、増殖率がよく、しかもラグフェイズがない大腸菌群増殖用培地が望まれていた。

〔課題を解決するための手段〕

斯かる実情において、本発明者は鋭意研究を行った結果、上記目的にあった培地を得ることに成功した。

すなわち、本発明は、重量で、ペプトン1.0~2.5%、塩化ナトリウム0.25~0.5%、酵母エキス0.4~0.6%、グリセロール0.5~1.5%、リン酸一水素二カリウム0.2~0.5%、ビルビン酸ナトリウム0.05~5.0%、硝酸カリウム0.05~1.0%、牛胆汁末1.0~2.0%及び寒天0.1~0.3%を含有する大腸菌群増殖用培地に係る第1の発明と、この培地に更に、4-メチルーウンベリフェリル- β -D-ガラクトシド又は4-メチ

腸菌群の生育性を試験した結果、増殖率がよく、かつラグフェイズがなかったのはBHIのみであった。そこで、このBHI培地中のどの組成成分が増殖因子になっているかを調べるために次の実験を行った。

実験1

E. coli. ATCC 11775(普通ブイオンで37℃、24時間培養したものを小分けし、ドライアイス・アルコールで瞬間凍結した後-80℃で保存したものを、用時融解して使用する)を第1表に示す各培地に接種し、37℃のウオーターバスで培養し、定期的にサンプリングした後、菌数を測定し、ジェネレーションタイムと増殖率を算出した。これと同時にラグフェイズの有無を観察した。

尚、本明細書において、菌数測定は次のように行われる。すなわち、細菌を接種した培地を原液とし、10倍段階希釈し、その1mlを滅菌シャーレにとり、ここにあらかじめ加温溶解し45℃ぐらいにたもってあるデゾキシコレート培地を注ぎ、ただちにシャーレを静かに動かし、よく培

地と菌液を混合し、平板に固まらせ37℃で24時間培養した後、菌数を測定する。

その結果を第2表に示す。

第1表

| 培地番号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|-----------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ポリペプトン1%(BBL) | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 塩化ナトリウム0.5% | - | + | - | - | + | + | - | + |
| リン酸一水素ニカリウム 0.25% | - | - | + | - | + | - | + | + |
| リン酸一水素二ナトリウム 0.25% | - | - | - | + | - | + | + | + |

(pH7.0 ± 0.1)

(注) + : 含む、- : 含まない。

以下余白

第2表

| 培地番号 | ジェネレーションタイム ¹⁾ | 増殖率 | ラグフェイズ ²⁾ |
|------|---------------------------|-------|----------------------|
| 1 | 41.75 | 0.024 | 2/3 |
| 2 | 31.21 | 0.032 | 1/3 |
| 3 | 29.81 | 0.034 | 1/3 |
| 4 | 36.31 | 0.028 | 0/3 |
| 5 | 17.65 | 0.057 | 0/3 |
| 6 | 39.18 | 0.026 | 1/3 |
| 7 | 25.43 | 0.039 | 0/3 |
| 8 | 18.30 | 0.055 | 0/3 |

1) 時間単位: 分

2) ラグフェイズの出現回数/実験回数

この実験の結果から、ポリペプトン、塩化ナトリウム及びリン酸一水素ニカリウムが大腸菌群の増殖に関与していることが明らかとなった。

また、特開昭57-144995号公報には、胆汁酸を添加して大腸菌群以外の微生物の生育を抑制することができることが記載されている。そこで、本発明者は、牛胆汁末の添加効果について次の実験を行った。

実験2

ポリペプトン1%、塩化ナトリウム0.5%及びリン酸一水素ニカリウム0.25%を含む基礎培地に種々の濃度で牛胆汁末を添加した培地にE. coliを接種し、実験1と同様にして培養して菌数を測定した。その結果を第3表に示す。

第3表

| | ジェネレーションタイム ¹⁾ | 増殖率 | ラグフェイズ ²⁾ |
|---------------|---------------------------|-------|----------------------|
| 基礎培地 | 14.79 | 0.103 | 1/3 |
| 基礎培地+牛胆汁末0.5% | 25.72 | 0.048 | 2/3 |
| 基礎培地+牛胆汁末1.0% | 6.81 | 0.153 | 0/3 |
| 基礎培地+牛胆汁末1.5% | 5.43 | 0.186 | 0/3 |
| 基礎培地+牛胆汁末2.0% | 7.88 | 0.125 | 0/3 |
| 基礎培地+牛胆汁末2.5% | 23.12 | 0.074 | 2/3 |
| 基礎培地+牛胆汁末3.0% | 20.59 | 0.090 | 1/3 |

1), 2) は第2表に同じ

以下余白

以下余白

この実験から、牛胆汁末は大腸菌群以外の微生物の生育を抑制するばかりでなく、大腸菌群の生育を促進させること、並びにその培地中の最適濃度は1.0～2.0%であることが見出された。

更にまた、大腸菌群の生育に有用であることが予想される成分について次の実験を行った。

実験3

実験2の基礎培地に牛胆汁末1.5%を添加した培地（牛胆汁末添加基礎培地）に各物質を添加した第4表に示す培地にE.coliを接種し、実験1と同様にして培養後菌数を測定した。その結果を第5表に示す。

第4表

| 培地番号 | ① | ② | ③ | ④ | ⑤ | ⑥ | ⑦ |
|-----------------|---|---|---|---|---|---|---|
| 基礎培地+牛胆汁末1.5% | + | + | + | + | + | + | + |
| 硝酸カリウム 0.1% | - | + | + | + | - | + | + |
| ビルビン酸ナトリウム 0.1% | - | - | + | - | + | + | + |
| フマル酸ナトリウム 0.5% | - | - | - | + | + | + | + |
| ギ酸ナトリウム 0.3% | - | - | - | - | + | - | + |

以下余白

以下余白

第5表

| 培地番号 | ジェネレーションタイム ¹⁾ | 増殖率 | ラグフェイズ ²⁾ |
|------|---------------------------|-------|----------------------|
| ① | 4.75 | 0.211 | 0/3 |
| ② | 4.12 | 0.243 | 0/3 |
| ③ | 2.60 | 0.384 | 0/3 |
| ④ | 3.79 | 0.264 | 0/3 |
| ⑤ | 4.73 | 0.211 | 0/3 |
| ⑥ | 2.98 | 0.336 | 0/3 |
| ⑦ | 3.04 | 0.329 | 0/3 |

1), 2) は第2表に同じ

以下余白

この実験の結果、牛胆汁末添加基礎培地に硝酸カリウム及びビルビン酸ナトリウムを添加した培地が、ジェネレーションタイム及び増殖率において優れていた。

本発明の培地において、ビルビン酸ナトリウムは、菌体内で各種の代謝経路を結ぶ重要な中間生成物で、ビルビン酸を添加することにより、菌体内活性を促進する作用をするものであり、その添加量は0.05～5.0%が好ましい。また硝酸カリウムはエネルギー獲得手段として大腸菌群にとって重要であり、その添加量は0.05～1.0%が好ましい。

以上の組成の本発明培地は大腸菌群の増殖が速いので、これに4-メチルーウンベリフェリル-β-D-ガラクトシド〔4-MUGal〕又は4-メチルーウンベリフェリル-β-D-グルクロニド〔4-MUGul〕を含有せしめれば優れた大腸菌検出用培地が得られる。

本発明で大腸菌群とは、ラクトースを分解する能力を有する一群の微生物で、エシェリキヤ属、

サイトロバクター属、クレブシエラ属、エンテロバクター属、セラチヤ属に属するものである。

本発明の培地の基質である4-MUGal及び4-MUGulは培地中に 10^{-4} M $\sim 10^{-2}$ M程度添加するのが好ましい。

〔作用〕

本発明の大腸菌群検出用培地を用いて、被検体中の大腸菌群の存在を検出するには、当該培地に被検体を加えて約37℃で数時間～十数時間培養する。基質の4-MUGal及び4-MUGulは無色であるが、被検体中に大腸菌群が存在すると、これが産生する β -ガラクトシダーゼの作用によって4-メチル-ウンベリフェロン(4-MU)が生成され、4-MUは、蛍光性物質であり、330nmの波長で励起されて、450nmの蛍光を発するので、これを測定することにより大腸菌群の存在を確認することができる。

〔実施例〕

次に実施例を挙げて説明する。

実施例1

ビラノシド 1×10^{-3} モルを添加した培地及び実施例1の大腸菌群検出用培地を用いて初発菌数と蛍光発現時間との関係を比較した。その結果を表1に示す。

なお、比較方法は両方の培地を96穴透明Uプレートに100 μ ずつ分注しておき、各濃度の菌を100 μ 接種し、MTP-32 MICROPLATE READER(CORONA)で蛍光の発現する時間を一時間ごとに測定した。

下記組成の本発明大腸菌群検出用培地を調製した。

| | |
|--------------------------------------|-----------------------|
| トリプチケースペプトン(BBL) | 10 g |
| フィトン ペプトン(BBL) | 5 g |
| 塩化ナトリウム | 5 g |
| 酵母エキス(Difco) | 5 g |
| グリセロール | 10 g |
| リン酸一水素二カリウム | 2.5 g |
| ビルビン酸ナトリウム | 1 g |
| 硝酸カリウム | 1 g |
| 牛胆汁末 | 15 g |
| 寒天 | 3 g |
| 4-MUGal | 1×10^{-3} モル |
| イソプロピル β -D-チオガラクト ラクトビラノシド | 1×10^{-3} モル |
| 精製水 | 1000 ml |
| | pH 7.0 \pm 0.1 |

実施例2

ハートインフュージョン培地に4-MUGal 1×10^{-3} モル及びイソプロピル β -D-チオガラクト

以下余白

表 1

| 菌 株 | 初発菌数 (Log CFU/ml) | 蛍光発現時間 (時) * | |
|------------------------------------|----------------------|---------------|------------|
| | | ATCC 11775 培地 | 大腸菌培地 山田培地 |
| <i>B. coli</i> ATCC 11775 | 5.76 | 5 | 5 |
| | 4.81 | 6 | 6 |
| | 3.85 | 8 | 7 |
| | 2.76 | 24 | 8 |
| | 1.86 | 24 | 24 |
| <i>C. freundii</i> ATCC 8090 | 5.64 | 24 | 6 |
| | 4.65 | 24 | 8 |
| | 3.38 | 24 | 24 |
| | 2.45 | 24 | 24 |
| | 1.45 | 24 | 24 |
| <i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883 | 5.32 | — | 7 |
| | 4.28 | — | 8 |
| | 3.34 | — | 24 |
| | 2.26 | — | 24 |
| | 1.30 | — | 24 |
| <i>K. ozaenae</i> ATCC 11296 | 5.04 | — | 7 |
| | 4.36 | — | 8 |
| | 3.26 | — | 24 |
| | 2.08 | — | 24 |
| | 1.40 | — | 24 |
| <i>K. oxytoca</i> ATCC 13182 | 5.65 | 5 | 6 |
| | 4.63 | 7 | 7 |
| | 3.36 | 8 | 8 |
| | 2.71 | 24 | 24 |
| | 1.32 | 24 | 24 |
| <i>B. cloacae</i> ATCC 13047 | 5.34 | 24 | 8 |
| | 4.20 | 24 | 24 |
| | 3.20 | 24 | 24 |
| | 2.23 | 24 | 24 |
| | 1.04 | 24 | 24 |
| <i>B. aerogenes</i> ATCC 13048 | 5.56 | 24 | 6 |
| | 4.94 | 24 | 7 |
| | 3.63 | 24 | 24 |
| | 2.72 | 24 | 24 |
| | 0.69 | 24 | 24 |

* : 4 MUの生成が 7.5×10^{-4} M以上
 — : 24時間培養後で蛍光を認めない。

実施例 3

実施例 2 と同じ培地を用いて、食肉製品における初発菌数と蛍光発現時間との関係を比較した。比較方法は実施例 2 と同様に行なった。その結果を表 2 に示す。

以下余白

表 - 2

| 菌 株 | 初発検出回数 (Log CFU/g) | 蛍光発現時間 (時) * | | | | | | | | | |
|------------------------------------|----------------------------|------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | | ロースハム | | | | | チルドハンバーグ | | | | |
| | | ハート | 大腸菌 | ハート | 大腸菌 | ハート | 大腸菌 | ハート | 大腸菌 | ハート | 大腸菌 |
| <i>E. coli</i> ATCC 11775 | 6 5 4 3 2 1 | 6 8 24 24 - - | 5 6 8 24 - - | 6 7 8 24 24 24 | 5 6 8 24 24 24 | 6 7 8 24 24 24 | 5 6 8 24 24 24 | 6 7 8 24 24 24 | 5 6 7 8 24 24 | 5 6 7 8 24 24 | 5 6 7 8 24 24 |
| <i>C. freundii</i> ATCC 8090 | 5 4 3 2 1 | 8 24 24 24 - | 6 8 24 24 - | 8 24 24 24 24 | 6 8 24 24 24 | 8 24 24 24 24 | 6 8 24 24 24 | 8 24 24 24 24 | 6 7 8 24 24 | 7 8 24 24 24 | 6 7 8 24 24 |
| <i>K. pneumoniae</i> ATCC 13633 | 5 4 3 2 1 | 24 24 24 24 - | 6 7 24 24 - | 24 24 24 24 24 | 8 24 24 24 24 | 24 24 24 24 24 | 24 24 24 24 24 | 24 24 24 24 24 | 7 24 24 24 24 | - 24 24 24 24 | 6 8 24 24 24 |
| <i>K. ozonae</i> ATCC 12296 | 5 4 3 2 1 | 24 24 24 24 - | 8 24 24 24 - | 24 24 24 24 24 | 7 24 24 24 24 | 24 24 24 24 24 | 24 24 24 24 24 | 24 24 24 24 24 | 7 24 24 24 24 | - 24 24 24 24 | 6 7 24 24 24 |
| <i>K. oxytoca</i> ATCC 13182 | 5 4 3 2 1 | 7 24 24 24 - | 6 8 24 24 - | 7 8 24 24 24 | 6 8 24 24 24 | 7 8 24 24 24 | 6 8 24 24 24 | 7 8 24 24 24 | 6 7 8 24 24 | 6 7 8 24 24 | 5 6 7 8 24 |
| <i>B. cloacae</i> ATCC 13047 | 5 4 3 2 1 | 24 24 24 24 - | 24 24 24 24 - | 24 24 24 24 24 | 24 24 24 24 24 | 24 24 24 24 24 | 24 24 24 24 24 | 24 24 24 24 24 | 24 24 24 24 24 | 24 24 24 24 24 | 24 24 24 24 24 |
| <i>B. aerogenes</i> ATCC 13048 | 5 4 3 2 1 | 24 24 24 24 - | 7 8 24 24 - | 24 24 24 24 24 | 7 8 24 24 24 | 24 24 24 24 24 | 24 24 24 24 24 | 24 24 24 24 24 | 24 24 24 24 24 | 24 24 24 24 24 | 24 24 24 24 24 |

*: 4NUの生成が 7.5×10^{-4} M以上

1): ハートインフュージョン培地

2): 大腸菌検出用培地

実施例 4

実施例 2 と同じ培地を用いて、市販食肉及び食肉製品の腸菌群の検査を行った。その結果を表 - 3 に示す。

検査方法は両方の培地を 96 穴透明 U プレートに 100 μ l ずつ分注しておき、そこにストマッカーで処理した検体原液 100 μ l を接種し、37℃ で培養しながら一時間ごとに MTP-32

MICROPLATE READER (CORONA) で測定し蛍光発現時間を計った (プレート法)。それと同時に、検体原液を適当に希釈しデソキシコレート培地で混濁し (Deso混濁法) 大腸菌群のコロニー発現数を測定した。

プレート法は従来の Deso混濁法とよく一致しているのがよくわかり、しかも Deso混濁法は最低 18 時間の培養時間が必要だが、プレート法は最高 8 時間で大腸菌群の確認ができた。更に、ハートインフュージョンを使用するよりも本発明の培地を使用した方が明かに蛍光発現時間の短縮が認められる。

表 - 3

| 食 肉 製 品 | Deso混濁法 (LogCFU/g) | プ レ ー ト 法 | |
|----------------|-----------------------|---------------------|----------------------|
| | | ハート培地 ¹⁾ | 大腸菌群培地 ²⁾ |
| 牛 挽 肉 | 7.15 | +4* | +3 |
| 牛 刺 身 | 3.59 | +8 | +7 |
| 牛スタミナ漬 | 5.23 | +8 | +7 |
| 牛ローススライス肉 | 6.32 | +5 | +4 |
| アメリカンビーフ牛切り落とし | 4.23 | +8 | +7 |
| 豚赤身焼肉 | 8.04 | +4 | +3 |
| 豚スタミナ漬 | 6.78 | +8 | +7 |
| 豚切り落とし | 6.94 | +6 | +5 |
| 馬肉刺身 (生食) | 5.23 | +8 | +7 |
| 若鳥もも小間切 | 5.51 | +5 | +4 |
| 若鳥ササミ | 6.91 | +5 | +4 |
| 若鳥焼肉 | 5.85 | +3 | +3 |
| 若鳥たたき (生食) | 4.11 | +6 | +5 |
| ロースハム (スライス) | <1.00 | - | - |
| ウインナーソーセージ | <1.00 | - | - |
| チルドハンバーグ | <1.00 | - | - |
| チルドミートボール | <1.00 | - | - |

*: 蛍光検出時間 (時)

1): ハートインフュージョン培地

2): 大腸菌群検出用培地

〔発明の効果〕

本発明の培地は大腸菌群をジェネレーションタイムが速く、増殖率がよく、ラッグフェイズがなく増殖させることができ、大腸菌群の検出用培地として有利に使用できる。

以 上

出願人 日 水 製 薬 株 式 会 社

代理人 弁理士 有 賀 三



弁理士 高 野 登 志 雄



弁理士 中 嶋 俊 夫

